

Attachment
7/7/8

Production of recombinant thermophilic alpha-amylase active at low pH

Production of recombinant thermophilic alpha-amylase active at low pH

Patent Number: FR2778412
Publication date: 1999-11-12
Inventor(s): BELARBI ABDEL;; HAYE BERNARD;; LEVEQUE EMMANUEL
Applicant(s): UNIV REIMS CHAMPAGNE ARDENNES (FR)
Requested Patent: ☐ FR2778412
Application Number: FR19980005655 19980505
Priority Number(s): FR19980005655 19980505
IPC Classification: C12N9/28
EC Classification: C12N9/28
EC Classification: C12N9/28
Equivalents:

Abstract

Production of thermophilic alpha -amylase is new and comprises expressing *Thermococcus hydrothermalis* alpha -amylase gene in *Escherichia coli*. Production of thermophilic alpha -amylase comprises: (a) preparing an oligonucleotide probe specific for the alpha -amylase gene of a *Thermococcus hydrothermalis* strain (CNCM I-1319), the probe being SA221-Dig (digoxigenin-labeled sequence of 221 nucleotides given in the specification); (b) digesting chromosomal DNA of the *T. hydrothermalis* strain with *EcoRI*; (c) detecting the alpha -amylase gene by hybridization with SA221-Dig; (d) recovering DNA fragments by electrophoresis and ligating them into plasmid pKS-; (e) transforming *Escherichia coli* DH5 alpha with the ligation mixture by the calcium chloride method; and (f) extracting plasmids from the bacteria and recovering plasmid pEAMY101 containing the alpha -amylase gene. An Independent claim is also included for an alpha -amylase enzyme produced by the process.

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 778 412

②1 N° d'enregistrement national :

98 05655

⑤1 Int Cl⁶ : C 12 N 9/28

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 05.05.98.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 12.11.99 Bulletin 99/45.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : Se reporter à la fin du
présent fascicule

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : UNIVERSITE DE REIMS CHAMPA-
GNE ARDENNES Etablissement public — FR.

⑦2 Inventeur(s) : LEVEQUE EMMANUEL, BELARBI
ABDEL et HAYE BERNARD.

⑦3 Titulaire(s) :

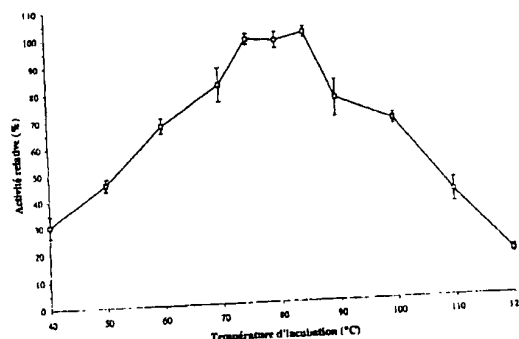
⑦4 Mandataire(s) : CABINET HAMMOND.

⑤4 PROCÉDE POUR PREPARER UNE ENZYME ALPHA-AMYLASE THERMOPHILE ET ENZYME AINSI
OBTENUE.

⑤7 Procédé pour préparer une enzyme α -amylase à partir
d'une souche archaebactérienne *Thermococcus hydrother-
malis* (CNCM 1-1319), selon lequel on isole le gène codant
pour cette α -amylase et on l'introduit dans une souche de
bactérie de l'espèce *E. coli*.

L'enzyme α -amylase produit par cette souche modifiée
est thermophile.

Application à l'industrie de l'amidon.



FR 2 778 412 - A1



La présente invention concerne un procédé pour préparer une enzyme α -amylase thermophile à partir de la souche archaebactérienne thermophile *Thermococcus hydrothermalis* (CNCM I-1319) et l'enzyme ainsi obtenue.

Les enzymes α -amylases sont utilisées pour la production de métabolites qui présentent de nombreuses applications industrielles aussi bien dans le domaine agro-alimentaire tel que par exemple en boulangerie pâtisserie, en alimentation diététique, en boissons, en confiserie, que hors de ce domaine tel que par exemple dans les colles et adhésifs, les détergents, la chimie, la pharmacie, la fonderie, etc...

Mais une des utilisations les plus courantes des α -amylases est leur emploi dans la dégradation de l'amidon en dextrines, cyclodextrines, maltodextrines, ou encore en maltose. Ces produits de dégradation peuvent ensuite entrer dans de nombreux procédés industriels comme par exemple dans la fabrication de nutriments, d'épaississants ou de stabilisants. Les produits issus de l'hydrolyse de l'amidon obtenus par l'action d'une α -amylase peuvent être, à leur tour, transformés en d'autres molécules d'intérêt : par exemple le glucose peut être transformé en fructose ou en sorbitol.

Certes, l'hydrolyse de l'amidon peut se faire chimiquement, mais actuellement celle-ci est réalisée par des procédés enzymatiques. La technique enzymatique a notamment pour avantage la production en moindre quantité de produits indésirables que l'hydrolyse chimique.

Il doit être rappelé que l'amidon étant faiblement soluble à la température ambiante, il est difficilement attaquant par les α -amylases. Pour permettre une hydrolyse, ou liquéfaction, il est donc nécessaire de le solubiliser pour rendre les molécules d'amidon accessibles aux enzymes. Cette étape de solubilisation de

l'amidon, aussi appelée gélatinisation, est réalisée à des températures d'au moins 70°C et pouvant atteindre 100°C. Ce traitement thermique empêche aussi la contamination bactérienne. La liquéfaction de l'amidon par une α -amylase est donc réalisée à haute température et nécessite l'emploi d'enzymes actives aux températures élevées utilisées dans l'industrie de l'amidon.

En outre, cette étape de liquéfaction est réalisée à un pH acide pour limiter la formation de produits indésirables tels que ceux obtenus si le pH est trop basique, notamment si cette étape est suivie d'une étape de saccharification pour obtenir du glucose.

Du fait des conditions d'hydrolyse enzymatique de l'amidon, telles que décrites ci-dessus, on cherche à utiliser des α -amylases thermophiles et actives à un pH acide pour réaliser la liquéfaction de l'amidon.

Actuellement les α -amylases utilisées proviennent de bactéries mésophiles dont un petit nombre possède une activité thermophile. On citera l' α -amylase de *Bacillus liqueniformis* (Termamyl, Novo Nordisk), l' α -amylase de *Bacillus subtilis* (Speedase, Nagase & CO Ltd). Celles-ci sont généralement actives à un pH compris entre 6,0 et 6,5 c'est-à-dire trop peu acide.

On connaît également des micro-organismes thermophiles appartenant à la classe des archaebactéries qui sont doués d'activité amylolytique thermophile : *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus woesei*, *Thermococcus profundus*.

L'utilisation de l'un ou l'autre des micro-organismes cités ci-dessus peut être une solution pour les industriels. Cependant leur culture est délicate (températures et pressions élevées, anaérobiose, production de produits soufrés comme H_2S , ...) et, de plus, les quantités d'enzymes produites par ces micro-organismes sont relativement faibles.

Aussi un des buts de la présente invention est-il de fournir un procédé pour préparer une enzyme α -amylase thermophile qui est active à un pH relativement acide.

Un autre but de l'invention est de fournir un tel procédé qui permet une
5 production en quantité notable d' α -amylase.

Ces buts, ainsi que d'autres qui apparaîtront par la suite, sont atteints par un procédé pour préparer une enzyme α -amylase thermophile à partir d'une souche archaebactérienne *Thermococcus hydrothermalis* (CNCM I-1319), dont le gène a été introduit par génie génétique dans le génome d'un micro-organisme mésophile.

10 Il comprend les étapes suivantes :

- a) on prépare une sonde nucléotidique caractéristique du gène de l' α -amylase de ladite souche *Thermococcus hydrothermalis* et nommée SA221-Dig.,
- b) on digère l'ADN chromosomique de ladite souche *Thermococcus hydrothermalis* par une enzyme de restriction Eco RI,
- 15 c) on détecte le gène codant pour ladite α -amylase par hybridation avec ladite sonde nucléotidique SA221-Dig.,
- d) on récupère des fragments d'ADN par une électrophorèse et on les ligue dans le plasmide pKS-,
- e) on transforme une souche *E. coli* DH5 α par le milieu réactionnel de la ligation à
20 l'aide de la méthode au CaCl₂,
- f) on extrait les plasmides des bactéries et on récupère un plasmide renfermant le gène codant pour l' α -amylase dénommé pEAMY 101.

Avantageusement, on sous-clone un fragment Eco RI-Xba I contenu dans le plasmide pEAMY 101 et on le met sous la dépendance du promoteur *lac* du vecteur
25 pKS-, le nouveau plasmide ainsi obtenu étant dénommé p662EL100.

De préférence, on utilise de manière usuelle une bactérie et on récupère à partir du surnageant de la culture l' α -amylase produite.

La présente invention est également relative à une enzyme α -amylase produite selon le procédé décrit ci-dessus.

5 Avantageusement, l' α -amylase est récupérée par expression des plasmides pEAMY101 ou p662EL100 contenus dans la bactérie *E. coli*.

De préférence, cette enzyme présente une activité maximale pour un pH compris entre 5,0 et 5,5 et une température comprise entre 75°C et 85°C.

10 Ne disposant d'aucun renseignement sur l' α -amylase de la souche archaebactérienne *Thermococcus hydrothermalis*, cette enzyme n'étant pas purifiée à ce jour, en se basant sur les séquences des α -amylases disponibles et sur le fait que ces enzymes possèdent 4 régions consensus, il a fallu réaliser dans un premier temps une sonde nucléotidique spécifique du gène de l' α -amylase de la souche *Thermococcus hydrothermalis*. Cette sonde nucléotidique a été fabriquée en
15 utilisant la technique de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) décrite ci-dessous.

Parmi les séquences consensus retrouvées chez les enzymes amylolytiques et plus particulièrement parmi les régions II et IV, deux séquences en acides aminés ont été choisies :

20 • la première SEQ.ID.N°1 présente les caractéristiques suivantes :

Longueur :	6
Type :	acides aminés
Nombre de brins :	simple
Configuration :	linéaire

Type de molécule : peptide

et peut être représentée par la formule DG(L/W)R(I/F)D

- la seconde SEQ.ID.N°2 présente les caractéristiques suivantes :

Longueur : 6

5 Type : acides aminés

Nombre de brins : simple

Configuration : linéaire

Type de molécule : peptide

et peut être représentée par la formule FY(Q/A)NHD

10 Des oligonucléotides dégénérés ont été déduits à partir de ces séquences en acides aminés et synthétisés :

- la première SEQ.ID.N°3 présente les caractéristiques suivantes :

Longueur : 17

Type : acide nucléique

15 Nombre de brins : simple

Configuration : linéaire

Type de molécule : ADN synthétique

et peut être représentée par la formule GAYGGNYKNM GNWTNGA

- la seconde SEQ.ID.N°4 présente les caractéristiques suivantes :

20 Longueur : 18

Type : acide nucléique

Nombre de brins : simple

Configuration : linéaire

Type de molécule : ADN synthétique

25 et peut être représentée par la formule RTCRTGRTTN KSNACRAA

Ces oligonucléotides dégénérés sont nommés AMYR2 et AMYR4 respectivement et servent d'amorces pour les expériences de PCR. Les conditions PCR sont les suivantes : ADN génomique de *Thermococcus hydrothermalis* 25 ng ; amorces AMYR2 et AMYR4 100 pmoles chacune ; $MgCl_2$ 250 μM ; dNTPs 200 μM ;
5 Taq DNA polymérase (Proméga, France) 2U ; volume réactionnel 100 μl . Le tampon d'amplification utilisé a été fourni par la société Proméga (France) avec l'enzyme Taq DNA polymérase. L'ADN archaebactérien est, dans un premier temps, dénaturé par incubation à 94°C pendant 10 minutes. L'enzyme Taq DNA polymérase est alors ajoutée au mélange réactionnel, puis l'ensemble est soumis à
10 30 cycles d'amplification en utilisant le DNA Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer Cetus). Un cycle d'amplification est composé d'une incubation de 1 minute à 94°C (étape de dénaturation), suivie d'une incubation de 1 minute à 54°C (étape d'hybridation) et d'une incubation de 2 minutes à 72°C (étape de polymérisation).

Par cette méthode une partie de l'ADN chromosomique de la souche
15 *Thermococcus hydrothermalis* a pu être amplifiée. La visualisation des résultats des expériences de PCR et la détermination de la taille des éventuelles amplifications sont réalisées en soumettant le milieu réactionnel à une électrophorèse en gel d'agarose à 2 % [agarose 2 % ; tampon TBE : Tris-borate 0,090 M ; acide éthylènediaminotétraacétique (EDTA) 0,002 M (pH 8,2) ; Bromure d'éthidium
20 1 $\mu g/l$; 75 V ; 1 h]. Un amplifiât ayant une taille de 221 paires de bases (pb) a ainsi été obtenu. Cet amplifiât a ensuite été récupéré du gel d'agarose par électroélution à l'aide de l'appareil HBS-Elutor (Biometra). Le morceau de gel d'agarose contenant l'ADN est placé dans une des cupules prévues à cet effet ; puis la cupule est soumise à une électrophorèse pendant une heure sous une tension de 100 V.

Sous l'effet du courant électrique, l'ADN sort de l'agarose et s'accumule dans le fond de la cupule où on le récupère.

Pour pouvoir étudier cet amplifiât, il a fallu auparavant modifier cet ADN pour pouvoir le cloner. Les extrémités de ce fragment sont dans un premier temps rendues franches à l'aide du fragment de Klenow de l'ADN polymérase d' *E. coli*, puis ses extrémités 5'-OH sont phosphorylées à l'aide de l'enzyme T4 polynucléotide kinase. La ligation du fragment est réalisée en utilisant l'enzyme T4 DNA ligase. Toutes ces enzymes ont été fournies par la société Proméga (France) et les manipulations ont été réalisées selon le protocole décrit par cette société.

Le fragment d'ADN ainsi modifié est cloné dans le vecteur pBluescript II KS- (pKS-) (La Jolla, CA, USA) au niveau de son site Sma I. Le plasmide ainsi obtenu est nommé pB220I.

L'insert du plasmide pB220I (amplifiât obtenu par PCR) a été nommé SA221 et a été séquencé. Le séquençage a été réalisé avec un séquenceur automatique ABI model 377 (ABI-Perkin Elmer) en utilisant les primers universels du phage M13 marqués à la fluorescence. La DNA polymérase Ampli + Taq FS (ABI-Perkin Elmer) et la Thermosequenase (Amersham) ont été utilisées pour les cycles de séquençages. Les produits PCR ont été purifiés sur colonne Quiawell 8 (Quiagen). La séquence nucléotidique complète a été étudiée avec le Sequencer Package (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, ODA).

La séquence nucléotidique de l'amplifiât SA221, SEQ.ID.N°5, a pour caractéristiques :

Longueur :	221
Type :	acide nucléique
Nombre de brins :	double

Configuration : linéaire
Type de molécule : amplifiât de PCR

et est représentée à la figure 1.

Pour vérifier que cette séquence nucléotidique a bien un rapport avec le
5 gène recherché, il a été effectué des comparaisons avec les séquences déjà
existantes dans la banque de données du National Center of Biotechnology
Information (NCBI, USA).

Les résultats de cette recherche d'homologie ont montré que le fragment
d'ADN comportait des similitudes avec une partie du gène de l' α -amylase de
10 *Pyrococcus furiosus* ainsi qu'avec une partie de deux gènes codant pour des α -
amylases d'orge. La séquence nucléotidique de l'amplifiât SA221 était cependant
différente des autres séquences déjà connues.

La déduction de la structure en acides aminés et la recherche d'homologie
en acides animés, SEQ.ID.N°6, avec les séquences en acides aminés contenues
15 dans la banque de données du NCBI ont également été réalisées. Cette séquence
SEQ.ID.N°6, qui est représentée à la figure 2 a pour caractéristique :

Longueur : 73
Type : acides animés
Nombre de brins : simple
20 Configuration : linéaire
Type de molécule : protéine

On a ainsi obtenu une forte homologie entre cette séquence en acides
aminés déduite de l'amplifiât SA221 et différentes α -amylases archaebactériennes.
25 Ainsi, 94 % d'homologie ont été trouvés entre la séquence en acide aminé de
SA221 et une partie de l' α -amylase de la souche *Pyrococcus furiosus*. Ce

pourcentage d'homologie a atteint 96 % avec une partie de l' α -amylase de la souche *Thermococcus profundus*.

Les homologies obtenues au niveau des séquences en acides aminés ont permis de confirmer la manipulation précédente et leur hypothèse mais elles ont également permis de conclure que ce fragment d'ADN codait une partie d'une α -amylase d'origine archaebactérienne et que les résultats de PCR n'étaient pas dus à une éventuelle contamination.

Les homologies précédemment obtenues permettent de conclure que le fragment SA221, fabriqué par amplification d'une partie de l'ADN chromosomal de la souche *Thermococcus hydrothermalis*, est une partie d'un gène codant une α -amylase. De ce fait le fragment SA221 est utilisé comme sonde pour rechercher le gène codant l' α -amylase de *Thermococcus hydrothermalis*.

Pour utiliser le fragment SA221 comme sonde, il faut, d'une part, l'obtenir en grande quantité et, d'autre part, le marquer, c'est-à-dire lui permettre de pouvoir être repéré, ces deux manipulations ayant pour but de rendre le repérage de la sonde SA221 plus sensible. Le marquage de la sonde est réalisé en greffant sur celle-ci une molécule facilement détectable.

La production en grande quantité du fragment SA221 est réalisée à l'aide de nouvelles réaction de PCR, mais en utilisant le plasmide pB220I comme ADN matrice en remplacement de l'ADN chromosomique de la souche *Thermococcus hydrothermalis*. Les amplifiats ainsi obtenus sont ensuite marqués avec la digoxigénine-11-dUTP à l'aide du Kit Dig High Prime DNA Labeling (Boehringer Mannheim, France). Le marquage de ces amplifiats et la quantification de ce marquage sont réalisés selon le protocole fourni par la Société Boehringer Mannheim. La sonde marquée ainsi obtenue est nommée SA221-Dig.

Selon le procédé de la présente invention, on digère l'ADN chromosomique de la souche *Thermococcus hydrothermalis* (CNCM I-1319) par une enzyme de restriction telle que Eco RI commercialisée par la société Boehringer Mannheim. Les fragments d'ADN obtenus sont ensuite séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 0,8 % (poids/volume). Une partie du gel est conservée à 4°C pour 5 récupérer ultérieurement des fragments d'intérêt, et l'autre partie de ce gel sert au transfert et à la fixation des fragments d'ADN sur une membrane de nylon telle que celle commercialisée par la société Amersham sous la marque Hybond-N*. Pour cela le gel d'agarose dans lequel sont séparés les fragments d'ADN, est immergé 10 pendant 15 minutes dans une solution de dénaturation (NaCl 1,5 M et NaOH : 0,5 M) afin de dénaturer l'ADN.

Puis on immerge le gel dans une solution de neutralisation dont la composition est Tris-HCl 0,5 M (pH 7,5) et NaCl 1,5 M, à deux reprises pendant 15 minutes, puis une dernière fois pendant 30 minutes pour permettre de rééquilibrer 15 le pH. L'ADN est ensuite transféré sur la membrane de nylon par capillarité à l'aide d'un tampon de transfert (pH 7) tel que celui à base de NaCl 3M et de citrate sodique 0,3 M. Après une nuit de transfert à température ambiante, la membrane de nylon est placée quelques minutes sur du papier Whatmann 3MM imbibé d'un tampon SSC 2X (pH 7) comprenant du NaCl 0,15 M et du citrate sodique 0,015 M. 20 La fixation de l'ADN à la membrane de nylon est réalisée par exposition de cette dernière pendant 3 minutes à un rayonnement ultra-violet, puis par contact avec NaOH 0,4 M pendant 20 minutes. Puis la membrane de nylon est séchée à une température de 37°C.

Cette membrane de nylon est ensuite hybridée avec la sonde nucléotidique 25 SA221-Dig. Pour cela la membrane de nylon est pré-incubée à 47°C pendant 30

minutes dans un tampon d'hybridation pré-chauffé à 47°C, tel que celui composé du tampon SSC 5X de N-laurylsarcosine 0,1 %, de sodium dodécylsulfate (SDS) 0,02 %, de formamide 50 % et d'une solution de blocage (blocking solution) commercialisée par la société Boehringer Mannheim. La membrane est ensuite
5 mise à hybrider pendant 18 heures à 47°C dans le tampon d'hybridation contenant la sonde nucléotidique SA221-Dig. La révélation des bandes ayant hybridé la sonde SA221-Dig. a été réalisée comme décrit dans le kit de la société Boehringer Mannheim.

On a ainsi révélé un fragment de 4 kpb qui s'est hybridé sur la sonde
10 nucléotidique.

La récupération des fragments correspondants est réalisée à partir de la portion du gel d'agarose non-traitée et conservée à 4°C. Pour cela il est nécessaire d'effectuer une électroélution comme précédemment décrit. Ces fragments sont ensuite ligués dans le plasmide pKS- au niveau du site de restriction Eco RI. La
15 ligation de ces fragments dans le vecteur pKS- est réalisée avec l'enzyme T4 DNA Ligase (Proméga, France) avec un rapport fragment/vecteur de 20. Le milieu réactionnel de la ligation a ensuite été utilisé pour transformer la souche *E.coli* DH5 α (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD) à l'aide de la méthode au CaCl₂ (Cohen et al., 1972). La souche *E.coli* DH5 α a été choisie comme
20 réceptrice car elle ne possède pas la capacité d'hydrolyser l'amidon.

Les cellules ont ensuite été cultivées en milieu Luria-Bertani (milieu LB) préalablement additionné d'ampicilline (50 μ g/ml). Le milieu LB était composé de tryptone (10 g/l), d'extrait de levure (5 g/l) et de NaCl (5 g/l).

Les plasmides contenus par les bactéries sont ensuite extraits avec la
25 méthode décrite par Holmes et Quigley (1981). Pour cela, les bactéries sont

5 récupérées à partir de 5 ml de milieu LB additionné d'ampicilline par centrifugation (5000 g ; 2 minutes ; 4°C) et reprises dans du tampon STET [saccharose 8 % ; Triton X100 5 % ; EDTA 50 mM. ; Tris-HCl 50 mM. (pH 8,0)] puis 25 µl d'une solution de lysozyme à 10 mg/ml ont été ajoutés. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, la préparation est ensuite incubée pendant 1 minute à 100°C puis centrifugée (15000 g ; 15 minutes ; 4 °C). Le surnageant obtenu est débarrassé des protéines par ajout d'un volume de phénol. Après centrifugation (5000 g ; 5 minutes), la phase aqueuse est récupérée et un volume de chloroforme y est ajouté pour éliminer les traces de phénol pouvant être restées présentes. 10 Après une nouvelle centrifugation réalisée dans les mêmes conditions que la précédente, la phase aqueuse obtenue est débarrassée des ARNs par un traitement à l'ARNase (ARNase 10 µg/ml ; 60 minutes ; 37°C). La fraction ainsi obtenue contient les plasmides des bactéries étudiées.

15 Les plasmides renfermant le gène de l' α -amylase sont recherchés par hybridation avec la sonde SA221-Dig comme décrit auparavant après transfert et fixation sur une membrane de nylon à l'aide de l'appareil Bio-Dot apparatus (Bio-Rad, France).

Par cette technique on a isolé un plasmide qui s'est hybridé avec la sonde SA221-Dig. Ce plasmide est nommé pEAMY101.

20 La souche *E.coli* DH5 α est de nouveau transformée par le plasmide pEAMY101 pour vérifier si la souche *E.coli* DH5 α transformée est capable d'exprimer l' α -amylase de la souche archaebactérienne *Thermococcus hydrothermalis*. Pour cela, on cultive la souche *E.coli* DH5 α transformée par le plasmide pEAMY101 (*E.coli*(pEAMY101)) sur gélose à l'amidon [(tryptone 4g/l ; extrait de levure 2 g/l ; NaCl 5 g/l ; amidon 1 % ; ampicilline 50 µg/ml ; isopropylthio- 25

β -D-galactoside (IPTG) 1mM. ; agar-agar 10 g/l]. Après 24 h d'incubation à 37°C pour permettre le développement des bactéries, les géloses sont incubées à 60°C pendant une nuit. A cette température les micro-organismes sont tués. Par contre les éventuelles enzymes amylolytiques thermophiles produites sont capables d'hydrolyser l'amidon contenu dans la gélose. Pour détecter l'hydrolyse de ce substrat, on a utilisé la technique basée sur l'utilisation de la solution de Lugol. Pour cela, une solution de Lugol [I₂ 5 g/l ; KI 10 g/l] a été déposée sur la gélose pour visualiser les zones d'hydrolyse de l'amidon. La souche *E.coli* DH5 α a alors donné un faible halo de décoloration autour d'elle indiquant que cette souche *E.coli* était capable d'exprimer le gène de l' α -amylase de *Thermococcus hydrothermalis*, mais à un faible niveau.

Pour augmenter la production de l' α -amylase thermophile, on a construit un autre plasmide, appelé p662EL100, dans lequel le fragment d'ADN archaebactérien codant l' α -amylase a été mis sous la dépendance d'un promoteur fort, en l'occurrence le promoteur de l'opéron lactose qui fait partie intégrante du vecteur pKS-. Pour cela, on a alors sous-cloné un fragment Eco RI-Xba I de 2,7 kpb contenu par l'insert du plasmide pEAMY101. Cette nouvelle construction a permis de retourner ce fragment d'ADN archaebactérien contenu dans le plasmide pEAMY101 pour le mettre sous la dépendance du promoteur *lac* du vecteur pKS-. Cette partie de l'insert du plasmide pEAMY101 est porteuse du gène de l' α -amylase de *Thermococcus hydrothermalis*.

La souche *E.coli* DH5 α a été transformée par le plasmide p662EL100 (*E.coli* (p662EL100)) et celle-ci a été testée sur gélose à l'amidon comme cela a été réalisé pour la souche *E.coli* (pEAMY101). La souche *E.coli* (p662EL100) a alors présenté un important halo de décoloration après révélation avec la solution de

Lugol, ce qui indique que l'on a réussi à surexprimer l' α -amylase recombinante issue de la souche *Thermococcus hydrothermalis*.

Le fragment contenu par le plasmide p662EL100 a alors été séquencé par la Société Eurogentec (Seraing, Belgique). La séquence nucléotidique SEQ.ID.N°7 de son insert présente les caractéristiques suivantes :

Longueur : 2705
Type : acide nucléique
Nombre de brins : double
Configuration : linéaire
10 Type de molécule : ADN génomique
et est représentée à la figure 3.

Dans ce fragment on trouve une seule phase de lecture (ORF pour Open Reading Frame) de 1374 nucléotides, SEQ.ID.N°8, présentant les caractéristiques suivantes :

15 Longueur : 1374
Type : acide nucléique
Nombre de brins : double
Configuration : linéaire
Type de molécule : ADN génomique

20 et est représentée à la figure 4, qui code une protéine de 457 acides aminés dont la séquence, SEQ.ID.N°9, présente les caractéristiques suivantes :

Longueur : 457
Type : acides aminés
Nombre de brins : simple
25 Configuration : linéaire

Type de molécule : protéine

et est représentée à la figure 5.

Cette protéine a un poids moléculaire de 51543 Da (valeur calculée). Elle est constituée d'un peptide signal de 22 acides aminés, SEQ.ID.N°10, qui présente les caractéristiques suivantes :

Longueur : 22

Type : acides aminés

Nombre de brins : simple

Configuration : linéaire

10 Type de molécule : peptide signal

et est représentée par la formule MARKVLVALL VFLVLSVSA VP, et d'une protéine mature de 435 acides aminés, SEQ.ID.N°11, qui présente les caractéristiques suivantes :

Longueur : 435

15 Type : acides aminés

Nombre de brins : simple

Configuration : linéaire

Type de molécule : protéine

et est représentée à la figure 6, et dont le poids moléculaire (valeur calculée) est de 49236 Da.

20

La souche *E.coli* transformée par le plasmide p662EL100 a été cultivée en milieu LB additionné d'ampicilline (50 µg/ml) ainsi que d'IPTG (1mM en final) qui est un inducteur du promoteur de l'opéron lactose, ce qui va favoriser l'expression de l' α -amylase recombinante. Le surnageant de culture a été récupéré par centrifugation (8000 g ; 10 minutes) et concentré 100 fois à l'aide d'une unité

25

Amicon et d'une membrane de type YM ayant un seuil de coupure de 10 kDa (Amicon, France). Les bactéries ont été également récupérées par centrifugation (8000 g ; 10 minutes ; 4°C), reprises avec un centième du volume initial dans de l'eau distillée et soniquées. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation
5 (10000 g ; 30 minutes . 4°C) et le surnageant obtenu sert d'extrait cellulaire.

Les deux préparations (surnageant et extrait cellulaire) sont utilisées pour tenter de localiser l'activité α -amylasique recombinante. Ceci a été réalisé par la technique du zymogramme. Cette technique est une électrophorèse en gel d'acrylamide dans lequel le substrat de l'enzyme étudiée est inclus et qui est
10 réalisée dans des conditions non-dénaturantes pour permettre le maintien de l'activité enzymatique recherchée. Le gel de séparation est constitué d'acrylamide (8 %), d'amidon (0,1 %) et de tampon Tris-HCl 1,5M. (pH 8,8). Après électrophorèse à 4°C, le gel est ramené à pH 5,5 par bains successifs d'acide maléique 0,1 % et de tampon phosphate 0,1M. (pH 5,5). Ces opérations ont pour
15 but de ramener le pH du gel à une valeur compatible avec l'activité α -amylasique étudiée. Le gel est ensuite incubé pendant 2 heures à 80°C et une solution de Lugol est versée dessus par la suite pour identifier les zones d'activités amylolytiques thermophiles. Par cette technique on a pu montrer que si la majeure partie de l'activité α -amylasique était retrouvée dans l'extrait cellulaire, cette activité était
20 également retrouvée dans le surnageant de culture, ce qui indique que l'enzyme recombinante est sécrétée par la colonie *E.coli* (p662EL100).

Le fait que l'enzyme soit sécrétée est important pour sa production à l'échelle industrielle. Ceci permet une récupération aisée de cette enzyme car elle est retrouvée dans le milieu de culture. D'autre part ceci permet d'avoir une
25 préparation enzymatique plus facile à purifier que si elle était uniquement localisée

dans le cytoplasme. Ceci est dû à la présence moindre de protéines et d'activités enzymatiques indésirables dans le surnageant de culture par comparaison avec le milieu intracellulaire.

Pour vérifier si l' α -amylase recombinante possède des propriétés physico-
5 chimiques intéressantes, on étudie son activité en fonction du pH et de la température.

Pour réaliser ce travail, différents tampons sont utilisés et permettent une étude sur une large gamme de pH allant de 3,0 à 8,0. Les tampons utilisés sont le tampon citrate-phosphate [acide citrique 0,05 M ; phosphate de sodium dibasique
10 0,1 M.] pour les pH de 3,0 à 7,0 et le tampon phosphate [phosphate de sodium monobasique 0,1 M ; phosphate de sodium dibasique 0,1 M] pour les pH de 5,5 à 8,0. Les réactions ont été réalisées à 80°C (température optimale de croissance de la souche *Thermococcus hydrothermalis*). Le milieu réactionnel (500 μ l) est constitué d'amidon à 1 %, de 125 μ l de solution enzymatique brute (surnageant de
15 culture en milieu LB additionné d'ampicilline (50 μ g/ml) et d'IPTG (1 mM) concentré 100 fois) et de tampon au pH étudié. Les incubations ont duré 15 minutes, puis après refroidissement dans de la glace fondante, les sucres réducteurs formés sont dosés par la méthode à l'acide parahydroxybenzoate d'hydrazide (Lever, 1972). Le calcul des sucres réducteurs produits par l'action de l'enzyme recombinante selon
20 la présente invention sur l'amidon est réalisé en retranchant à l'essai d'hydrolyse réalisé les valeurs de deux essais témoins : un témoin enzyme (réaction réalisée sans amidon) et un témoin substrat (réaction réalisée sans solution enzymatique).

Les résultats ont montré que l'optimum de pH est compris entre 5,0 et 5,5 (figure 7).

Pour déterminer la température à laquelle une activité optimale est obtenue, on utilise des milieux réactionnels de 500 µl comme cela est décrit précédemment. Le pH d'étude choisi découle des résultats précédents et est pH 5,0. Ces milieux sont incubés à des températures variant de 40°C à 120°C. La durée des incubations est de 15 minutes et les sucres réducteurs formés sont calculés comme précédemment décrit.

Cette expérience a montré que l'activité maximale est obtenue pour des températures comprises entre 75°C et 85°C (figure 8).

De même, les expériences de culture en milieu liquide de la colonie *E.coli* (p662EL100) montrent que cette activité peut avoir lieu à 37°C.

REVENDICATIONS

1. Procédé pour préparer une enzyme α -amylase thermophile à partir d'une souche archaebactérienne *Thermococcus hydrothermalis* (CNCM I-1319), dont le gène a été introduit par génie génétique dans le génome d'un micro-organisme
- 5 mésophile, caractérisé par le fait qu'il comprend les étapes suivantes :
- a) on prépare une sonde nucléotidique caractéristique du gène de l' α -amylase de ladite souche *Thermococcus hydrothermalis* et nommée SA221-Dig.,
 - b) on digère l'ADN chromosomique de ladite souche *Thermococcus hydrothermalis* par une enzyme de restriction Eco RI,
 - 10 c) on détecte le gène codant pour ladite α -amylase par hybridation avec ladite souche nucléotidique SA221-Dig.,
 - d) on effectue une électrophorèse afin de récupérer des fragments d'ADN et on la ligue dans le plasmide pKS-,
 - e) on transforme une souche *E. Coli* DH5 α par le milieu réactionnel de la ligation à
 - 15 l'aide de la méthode au CaCl₂,
 - f) on extrait les plasmides des bactéries et on récupère un plasmide renfermant le gène codant pour l' α -amylase dénommé pEAMY101.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que l'on sous-clone un fragment Eco RI-XbaI contenu par l'extrait du plasmide pEAMY 101 et on
- 20 le met sous la dépendance du promoteur *lac* du vecteur pKS-, le nouveau plasmide ainsi obtenu étant dénommé p662EL100.
3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé par le fait que l'on utilise de manière usuelle une bactérie et en ce que l'on récupère à partir du surnageant de la culture l' α -amylase produite.

4. Enzyme α -amylase, caractérisée par le fait qu'elle est obtenue par le procédé selon l'une des revendications 1 à 3.

5. Enzyme α -amylase selon la revendication 1, caractérisée par le fait qu'elle est récupérée par expression des plasmides pEAMY101 et p662EL100 contenus
5 dans la bactérie *E. coli*.

6. Enzyme α -amylase selon les revendications 4 et 5, caractérisée par le fait que son activité est maximale pour un pH compris entre 5,0 et 5,5 et une température comprise entre 75°C et 85°C.

GATGCTGGGC GGTGAGAG TACTGGGACA CCAACGTCGA TGCCTCCTG	50
AGCTGGGCCT ACGACAGCGG TGCTAAAGTC TTCGACTTCC CGCTCTACTA	100
CAAGATGGAC GAGGCCTTCG ATAACAACAA CATCCCCGCC CTCGTGGACG	150
CCCTCAAGAA CGGAGGCACG GTCGTCAGCC GCGACCCGTT CAAAGCCGTG	200
ACCTTCGTTG CCAACCACGA T	221

Fig. 1.

CWAVEGYWDT NVDALLSWAY DSGAKVFDFP LYYKMDEAFD NNNIPALVDA	50
LKNGGTVVSR DPFKAVTFVA NHD	73

Fig. 2.

GAATTCAGGC	AGGCCTACCT	CCAGGTCGAA	GCCGAGAGAC	TCGTGGGAAT	50
CCTTGAAAAG	GCGGGAATAG	AGATAAAAAG	CAGAGAAAAG	CTGAAAAGAAC	100
TCGTGAAGGA	GGTTCTGAAC	GAGATTGAGA	TCAACTCCCA	ATCCGTAATA	150
AAGAGGATAT	CGCAGGCGGA	AGTTGACCTG	ACGGAGATAG	AACTGTTCCA	200
CGTCCTCAAC	ATGCTGGTTT	TCATGCAGAG	CTGTGAGCTG	TCCGAGAAGG	250
CAAAAAAGAT	AAAGAAACTG	GTCGGATTCT	AGGCGGTCAT	CCCTACATAT	300
GAAACATGAT	GTCCCGTTTC	TGGCCCCCCA	TGGTGGACAA	TCACGCTCCC	350
CAATGCACAT	TAAAGACAAA	ACTTAAATAT	TTCACCATCG	GTGATATATT	400
CTGACCATCC	GGTGGTGAAT	GCCATGGCCA	GAAAGGTGTT	GGTTGCACTT	450
CTCGTATTTT	TAGTAGTTCT	CAGCGTCTCG	GCAGTTCCTG	CGAAGGCGGA	500
AACCCTTGAG	AACGGCGGGC	TCATAATGCA	GGCCTTCTAC	TGGGACGTCC	550
CAGGTGGAGG	AATCTGGTGG	GACACCATAG	CCCAGAAGAT	ACCCGACTGG	600
GCGAGCGCCG	GGATTTCCGC	AATATGGATT	CCTCCCGCGA	GTAAGGGCAT	650
GAGCGGCGGC	TATTCGATGG	GCTACGACCC	CTACGATTTT	TTCGACCTCG	700
GTGAGTACTA	CCAGAAGGGA	AGCGTTGAGA	CCCGCTTCGG	ATCAAAAGAG	750
GAGCTTGTGA	ACATGATAAA	CACCGCCCAT	GCTCACAACA	TGAAGGTCAT	800
AGCGGACATA	GTCATCAACC	ACCGCGCCCG	CGGCGACCTG	GAGTGGAAATC	850
CTTTCACCAA	CACCTACACC	TGGACCGATT	TCTCGAAGGT	CGCGTCGGGC	900
AAGTACACGG	CCAACCTACCT	CGACTTCCAC	CCGAACGAGC	TTCACGCGGG	950
CGATTCCGGA	ACATTTGGAG	GCTATCCCGA	CATATGCCAC	GACAAGAGCT	1000
GGGACCAGCA	CTGGCTCTGG	GCCAGCAACG	AAAGCTACGC	CGCCTACCTC	1050
CGGAGCATCG	GCATCGACGC	CTGGCGCTTC	GACTACGTCA	AGGGCTACGC	1100
TCCCTGGGTC	GTTAAGAAGT	GGCTGAACCG	GTGGGGCGGC	TGGGCGGTTG	1150
GAGAGTACTG	GGACACCAAC	GTCGATGCAC	TCCTGAGCTG	GGCCTACGAC	1200
AGCGGTGCTA	AAGTCTTCGA	CTTCCCGCTC	TACTACAAGA	TGGACGAGGC	1250
CTTCGATAAC	AACAACATCC	CCGCCCTCGT	GGACGCCCTC	AAGAACGGAG	1300
GCACGGTCGT	CAGCCGCGAC	CCGTTCAAAG	CCGTGACCTT	CGTTGCCAAC	1350
CACGATACCA	ACATAATCTG	GAACAAGTAT	CCGGCCTACG	CCTTCATCCT	1400
CACCTATGAG	GGACAGCCGG	CAATATTCTA	CCGCGACTAC	GAGGAGTGGC	1450
TCAACAAGGA	CAGGCTCAGG	AACCTCATCT	GGATACACGA	CCACCTCGCG	1500
GGAGGAAGCA	CAGACATCAT	CTACTACGAC	AGCGACGAGC	TTATCTTCGT	1550
GAGAAACGGC	TACGGGGACA	AGCCGGGACT	GATAACCTAC	ATCAACCTCG	1600
GCTCAAGCAA	GGCCGGAAGG	TGGGTCTACG	TTCCGAAGTT	CGCAGGCTCG	1650
TGCATACACG	AGTACACCGG	CAACCTCGGC	GGCTGGATTG	ACAAGTGGGT	1700
TGACTCAAGC	GGTCGGGTCT	ACCTTGAGGC	CCCCGCCAC	GACCCGGCCA	1750
ACGGCCAGTA	CGGCTACTCC	GTTTGGAGCT	ACTGCGGGGT	GGGCTGAAGT	1800
CTCCACTCCA	GTTGTTTTCA	TTCATTTTCA	TTCTTCTTGT	TTTCTGTTTA	1850
CGACGACACT	TGATTGGCTC	CCCGTCTCGC	GAATCCGGGC	CAGAGGAACT	1900
CAAAAATCCC	ACTGAGAAGC	CAGGCCGTGA	GGAACATCGC	CATCTCCTTC	1950
GAGATGCCGT	AAACAGTCCC	CTCAAGGAGC	AGGTACTCCG	CCCCACAGAG	2000
AACCACCAAA	GCAGCATACA	GAAGGACGTT	CCGAAGTAAA	AAGGCCCCCT	2050
CCAGTTTCCC	GTTCCGGAAC	TCCCAGCGGC	GGGGGAGGAG	GACACCCGCA	2100
ACCCAGAGAA	GGACCAGAAC	GAGCATCGTC	TCAGGAGAAA	GCCCTCTAAC	2150
CGCGAGGACG	GCGACCGCAA	GGATAACGGC	TGGAACCGAC	ATGAGCACCC	2200
GAACCGCGTT	TTTGTTAGACC	ATTTTTCATC	ACCCAGTTTC	GAGACATTAA	2250
AATATTTTGA	AAAACCTAAA	ATAGATTAGC	CTCTCTTCAC	ATAGACCCAT	2300
GACTGTCCGT	GACTGTCCAC	AACTTGTGTA	GCAGCATCTG	AGATCTTAGC	2350
CGCAGCAGCT	GACGCAGATA	ATGAAACCCC	TGGAGCCACT	ATTGAAACGT	2400
ATTTTGTGTT	TGGTAGTATA	TAGTATTTGC	GACCTGATTT	GTTGTACAGA	2450
TACGTCTCAA	AGTTGGACGC	AAGTGTCAAT	CCCGGCACTA	CAACGTTAGG	2500
ATAATAGTAG	TTACTTTTGG	TAACATACCA	GAAGTACTGA	TAATCGGTGG	2550
ATTCCAGTA	GTCACCTAGT	TTAAACCCCT	GAAACATTAT	GCCTCCCGCC	2600
GCAGACCATA	TAGCCATAGC	TATTGGCATT	GAAAGAGGTA	ACGCCGGAAG	2650
TCCAAGTAT	CCAAGCTACTA	TACTGGCTTT	TGCATAATTG	TCACTAAATT	2700
CTAGA					2705

ATGCCCAGAA AGGTGTTGGT TGCACCTCTC GTATTTCTAG TAGTTCTCAG	50
CGTCTCGGCA GTTCTGCGA AGGCGGAAAC CCTTGAGAAC GGCGGCGTCA	100
TAATGCAGGC CTTCTACTGG GACGTCCCAG GTGGAGGAAT CTGGTGGGAC	150
ACCATAGCCC AGAAGATACC CGACTGGGCG AGCGCCGGA TTTCCGGCAAT	200
ATGGATTCTT CCCGCGAGTA AGGGCATGAG CGGCGGCTAT TCGATGGGCT	250
ACGACCCCTA CGATTTCTTC GACCTCGGTG AGTACTACCA GAAGGGAAGC	300
GTTGAGACCC GCTTCGGATC AAAAGAGGAG CTTGTGAACA TGATAAACAC	350
CGCCCATGCT CACAACATGA AGGTCATAGC GGACATAGTC ATCAACCACC	400
GCGCCGGCGG CGACCTGGAG TGAATCCTT TCACCAACAG CTACACCTGG	450
ACCGATTTCT CGAAGGTCGC GTCGGGCAAG TACACGGCCA ACTACCTCGA	500
CTCCACCCG AACGAGCTTC ACGCGGGCGA TTCCGGAACA TTTGGAGGCT	550
ATCCCGACAT ATGCCACGAC AAGAGCTGGG ACCAGCACTG GCTCTGGGCC	600
AGCAACGAAA GCTACGCCGC CTACCTCCGG AGCATCGGCA TCGACGCCTG	650
GCGCTTCGAC TACGTCAAGG GCTACGCTCC CTGGGTCGTT AAGAACTGGC	700
TGAACCGGTG GGGCGGCTGG GCGGTTGGAG AGTACTGGGA CACCAACGTC	750
GATGCACTCC TGAGCTGGGC CTACGACAGC GGTGCTAAAG TCTTCGACTT	800
CCCGCTCTAC TACAAGATGG ACGAGGCCTT CGATAACAAC AACATCCCCG	850
CCCTCGTGGA CGCCCTCAAG AACGGAGGCA CGGTCGTCAG CCGCGACCCG	900
TTCAAAGCCG TGACCTTCGT TGCCAACCAC GATACCAACA TAATCTGGAA	950
CAAGTATCCG GCCTACGCCT TCATCCTCAC CTATGAGGGA CAGCCGGCAA	1000
TATTCTACCG CGACTACGAG GAGTGGCTCA ACAAGGACAG GCTCAGGAAC	1050
CTCATCTGGA TACACGACCA CCTCGCGGGA GGAAGCACAG ACATCATCTA	1100
CTACGACAGC GACGAGCTTA TCTTCGTGAG AAACGGCTAC GGGGACAAGC	1150
CGGGACTGAT AACCTACATC AACCTCGGCT CAAGCAAGGC CGGAAGGTGG	1200
GTCTACGTTT CGAAGTTCGC AGGCTCGTGC ATACACGAGT ACACCGGCAA	1250
CCTCGGCGGC TGGATTGACA AGTGGGTTGA CTCAAGCGGT CGGGTCTACC	1300
TTGAGGCCCC CGCCCACGAC CCGGCCAACG GCCAGTACGG CTACTCCGTT	1350
TGGAGCTACT GCGGGGTGGG CTGA	1374

MARKVLVALL VFLVVLVSVA VPAKAETLEN GGVIMQAFYW DVPGGGIWWD	50
TIAQKIPDWA SAGISAIWIP PASKGMSGGY SMGYDPYDFF DLGEYYQKGS	100
VETRFGSKEE LVNMINTAHA HNMKVIADIV INHRAGGDLE WNPFTNSYTW	150
TDFSKVASGK YTANYLDFHP NELHAGDSGT FGGYPDICH D KSWDQHWLWA	200
SNESYAAYLR SIGIDAWRFD YVKGYAPWV KNWLNRWGGW AVGEYWDITN	250
DALLSWAYDS GAKVDFDFPLY YKMDEAFDNN NIPALVDALK NGGTVVS RDP	300
FKAVTFVANH DTNIIWNKYP AYAFILTYEG QPAIFYRDYE EWLNKDRLRN	350
LIWIHDHLAG GSTDIIYYDS DELIFVRNGY GDKPGLITYI NLGSSKAGRW	400
VYVPKFAGSC IHEYTG NLGG WIDKWVDSSG RVYLEAPAH D PANGQYGYSV	450
WSYCGVG	457

Fig. 5

AKAETLENGG VIMQAFYWDV PGGGIWWDTI AQKIPDWASA GISAIWIPPA	50
SKGMSGGYSM GYDPYDFFDL GEYYQKGSVE TRFGSKEELV NMINTAHAHN	100
MKVIADIVIN HRAGGDLEWN PFTNSYTWTD FSKVASGKYT ANYLDFHPNE	150
LHAGDSGTFG GYPDICHDKS WDQHWLWASN ESYAAYLRSI GIDAWRFDYV	200
KGYAPWVVKV WLNRRWGGWAV GEYWDTNVDA LLSWAYDSGA KVFDFPLYK	250
MDEAFDNNNI PALVDALKNG GTVVSRRDPFK AVTFVANHDT NIIWNKYPAY	300
AFILTYEGQP AIFYRDYEEW LNKDRLRLNI WIHDHLAGGS TDIIYYDSDE	350
LIFVRNGYGD KPGLITYINL GSSKAGRWWY VPKFAGSCIH EYTGNLGGWI	400
DKWVDSSGRV YLEAPAHDPV NGQYGYSVWS YCGVG	435

Fig. 6

O : tampon Citrate-Phosphate

■ : tampon Phosphate

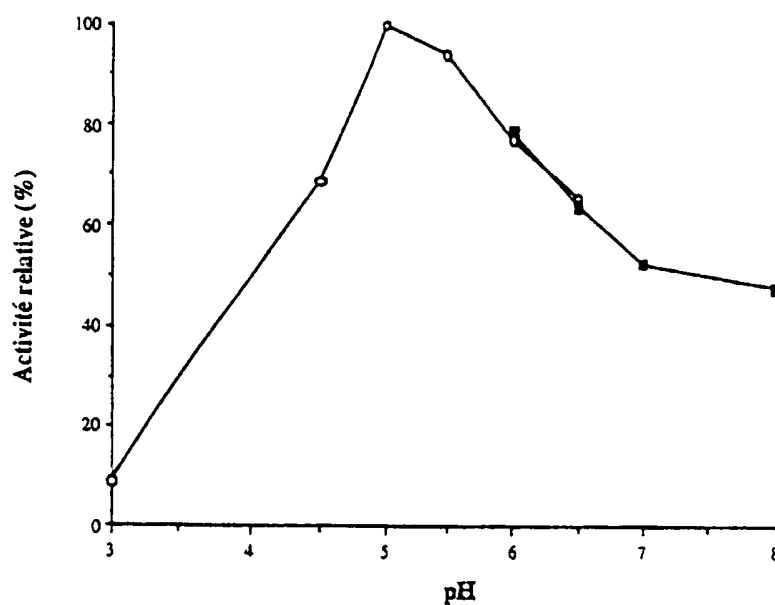
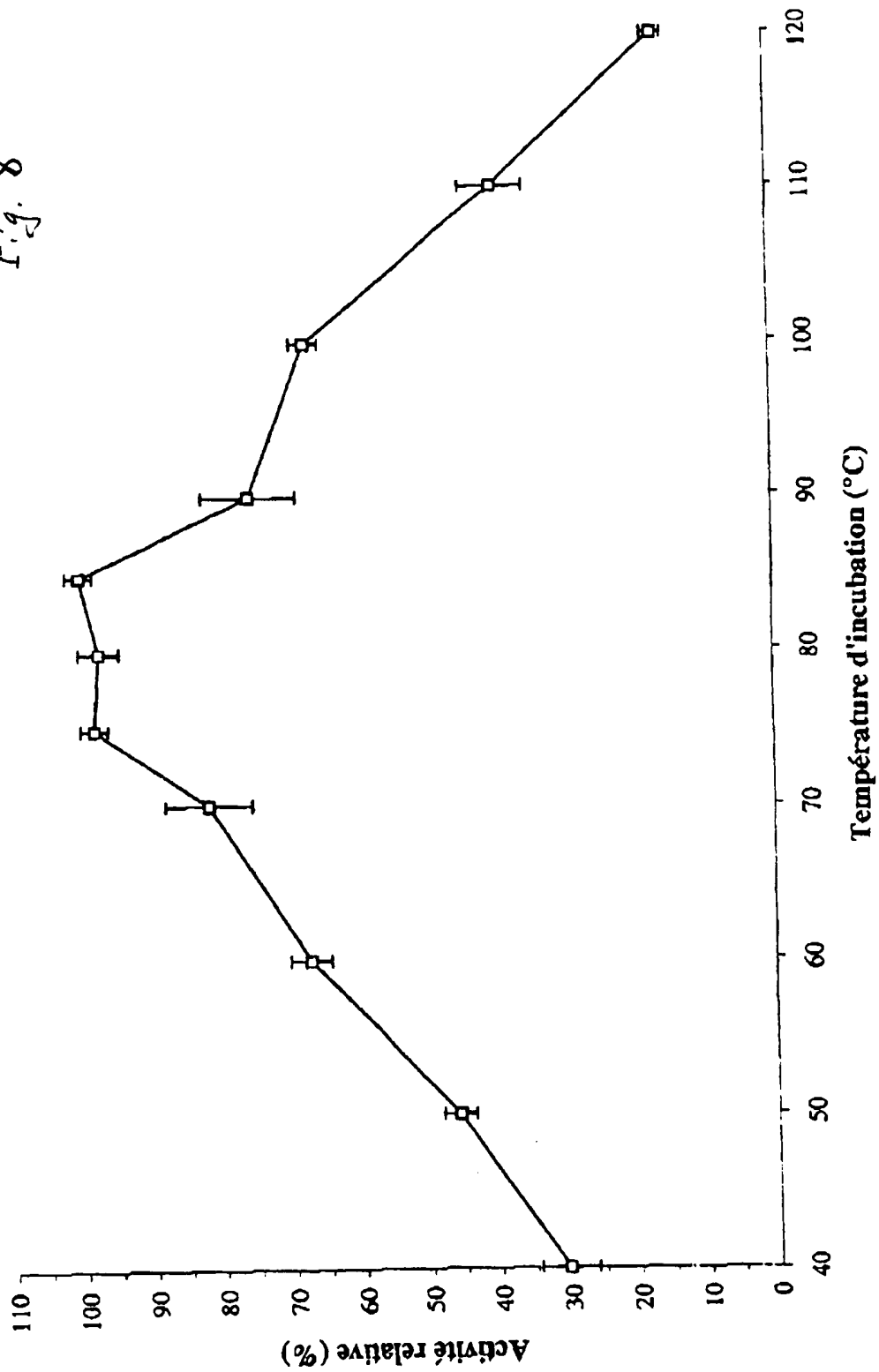


Fig. 7

Fig. 8



INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 558644
FR 9805655

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	LEGIN E ET AL: "Thermostable amylolytic enzymes of thermophilic microorganisms from deep-sea hydrothermal vents." COMPTES RENDUS DE L'ACADEMIE DES SCIENCES SERIE III SCIENCES DE LA VIE, vol. 320, no. 11, novembre 1997, pages 893-898, XP002093413	4-6
Y	* abrégé *	1-3
X	LEGIN E ET AL: "Production of thermostable amylolytic enzymes by Thermococcus hydrothermalis" BIOTECHNOLOGY LETTERS, vol. 20, no. 20, avril 1998, pages 363-367, XP002093414	4-6
Y	* abrégé *	1-3
Y	EP 0 120 693 A (NOVO INDUSTRI AS) 3 octobre 1984 * abrégé * * exemples 2,3 *	1-3
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C12N
		-/--
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
15 février 1999		Lejeune, R
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

3

EPO FORM 1503 03 82 (P04C13)

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

N° d'enregistrement
national

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 558644
FR 9805655

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 9804 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D16, AN 98-036036 XP002093415 & JP 09 289893 A (RIKAGAKU KENKYUSHO) , 11 novembre 1997 * abrégé * -& DATABASE GENESEQ Accession Number W44740, 20 mai 1998 RIKAGAKU KENKYUSHO: "T. profundus thermostable amylase" XP002093471 * 82.1% d'identité dans un chevauchement de 386 acides aminés *</p>	1-6
A	<p>WO 95 23852 A (NOVONORDISK AS ;SJOEHOLM CARSTEN (DK); ANTRANIKIAN GARABED (DE)) 8 septembre 1995 * abrégé * * exemple 1 *</p>	1-6
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.8)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
15 février 1999		Lejeune, R
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

3
EPO FORM 1503 03 82 (P04C13)